

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 43 32 256 C 1

⑳ Aktenzeichen: P 43 32 256.5-41  
㉑ Anmeldetag: 22. 9. 93  
㉒ Offenlegungstag: —  
㉓ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 9. 3. 95

㉔ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 N 5/16  
A 61 K 39/395  
G 01 N 33/577  
// C12N 15/85,15/81,  
5/18

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉕ Patentinhaber:

Lipp, Martin, Dr. Dr.habil, 80339 München, DE

㉖ Vertreter:

Deufel, P., Dipl.-Wirtsch.-Ing.Dr.rer.nat.; Hertel, W.,  
Dipl.-Phys.; Rutetzki, A., Dipl.-Ing.Univ.; Rucker, E.,  
Dipl.-Chem. Univ. Dr.rer.nat.; Huber, B., Dipl.-Biol.  
Dr.rer.nat.; Becker, E., Dr.rer.nat.; Steil, C., Dipl.-Ing.,  
80331 München; Kurig, T., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,  
83022 Rosenheim

㉗ Erfinder:

Lipp, Martin, Dipl.-Biol. Dr., 80339 München, DE;  
Förster, Reinhold, Dr., 81375 München, DE; Emrich,  
Thomas, Dipl.-Chem., 82393 Iffeldorf, DE; Wolf,  
Ingrid, Dipl.-Biol., 81371 München, DE; Kremmer,  
Elisabeth, Dr., 85354 Freising, DE

㉘ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
Eur. J. Immunol. 22, S. 2795-2799, 1992;

㉙ Monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

㉚ Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen  
Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren  
(L-GCR). Diese Antikörper sind durch folgende Verfahrens-  
schritte erhältlich:

(a) Einführung einer L-GCR-codierenden Nukleinsäure in  
Zellen und Expression von L-GCR,

(b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden  
Zellen von (a), und

(c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b)  
mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Anti-  
körper-produzierenden Hybridomzellen.

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung  
solcher Antikörper, ihre Verwendung und sie enthaltende  
Kits. Des weiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur  
Herstellung monoklonaler GCR-Antikörper.

DE 43 32 256 C 1

AM

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie sie enthaltende Kits. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

Es ist bekannt, daß bei der Transduktion von Signalen in einem Organismus Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Nach Bindung der Liganden an Zellmembran-integrierte Rezeptoren wird das Signal über verschiedene Mechanismen intrazellulär weitergeleitet und verarbeitet. Es gibt verschiedene Familien dieser Rezeptoren, die sich durch bestimmte Strukturmerkmale unterscheiden. Die sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, international abgekürzt als GCR (G protein-coupled receptors), werden in eine Familie zusammengefaßt. Das G-Protein ist ein heterotrimärer GTP-bindender Proteinkomplex, der aus den drei Untereinheiten G-alpha, G-beta und G-gamma aufgebaut ist. Es reguliert zelluläre Aktivitäten durch Austausch von GDP gegen GTP an seiner alpha-Untereinheit und aktiviert bzw. inaktiviert somit eine Reihe von Effektoren, wie Adenylcyclasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen und Ionenkanäle. Als Vertreter von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden Rezeptoren für Hormone und Neurotransmitter angesehen. Zu ihnen gehören adrenerge und muscarinerge Rezeptoren wie auch Rezeptoren für Dopamin, der Substanz P, Thyreotropin, Morphin u. a.

Des weiteren ergeben sich zunehmend Hinweise, daß G-Proteingekoppelte Rezeptoren auch an der Regulation der Aktivierung, Hemmung, Migration und Zell-Zell-Interaktion immunkompetenter Zellen beteiligt sind. Es ist bekannt, daß die Aktivierung von Leukozyten durch Entzündungsmediatoren, wie formyl-MLP, Anaphylatoxin C5a, Prostaglandine, Interleukin-8, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  sowie RANTES, ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt. Eine Blockierung dieser Rezeptoren würde eine Entzündungshemmung bewirken. Mittel hierfür wurden jedoch bisher noch nicht gefunden.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, mit denen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren blockiert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch Bereitstellung monoklonaler Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (L-GCR) erreicht. Diese Antikörper sind durch folgende Verfahrensschritte erhältlich:

(a) Einführung einer L-GCR-codierenden DNA in Zellen und Expression von L-GCR.

(b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und

(c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen.

Die L-GCR-codierende Nukleinsäure kann eine DNA, insbesondere eine genomische oder eine cDNA sein. Ferner kann sie eine RNA sein. Die Nukleinsäuren können durch übliche aus der Literatur bekannte Verfahren bereitgestellt werden (vgl. z. B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory (1982); Lipp et al., Eur. J. Immunol. 22 (1992), 2795—2799).

Erfindungsgemäß können in die L-GCR-codierende Nukleinsäure Modifikationen, wie Additionen, Deletion und/oder Substitution von ein oder mehr Basen eingeführt werden. Additionen umfassen Markersequenzen, die z. B. an das 5'-Ende oder 3'-Ende der L-GCR-codierenden Nukleinsäure fusioniert werden. Solche Markersequenzen sind z. B. Codons, die für ein Protein bzw. Proteinfragment codieren, gegen das ein monoklonaler Antikörper existiert. Mit letzterem kann die Expression des Proteins bzw. Proteinfragments und damit auch die von L-GCR nachgewiesen werden (vgl. von Zastrow und Kobilka, J. Biol. Chem. 267 (1992), 3530—3538; von Zastrow et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 763—766; T. Emrich, M. Lipp, unveröffentlicht). Markersequenzen können auch in die für L-GCR codierende Nukleinsäure, z. B. in die für die extra-zellulären oder intra-zellulären Domänen codierenden Sequenzen, eingefügt werden. Weitere Additionen sind Sequenzen, die eine Lokalisierung von L-GCR in der Zellmembran von L-GCR-exprimierenden Zellen gewährleisten. Solche Sequenzen können für Signalpeptide, Membranproteine oder Fragmente davon codieren. Üblicherweise werden sie an das 5'-Ende der L-GCR-codierenden Nukleinsäure fusioniert.

Erfindungsgemäß kann die L-GCR-codierende Nukleinsäure in einer Expressionseinheit vorliegen. Diese umfaßt die für die Transkription und Translation der L-GCR-codierenden Nukleinsäure notwendigen Sequenzen, wie Promotor-, Enhancer-, Ribosomenbindungs-, Transkriptionsstart- und stop- sowie Translationsstart- und stop-Sequenzen. Die Expressionseinheit kann ferner in einem Vektor vorliegen. Dies kann auch ein Virus sein. Dem Fachmann ist bekannt, welche der Sequenzen der Expressionseinheit in welcher Anordnung notwendig sind, um L-GCR in bestimmten Zellen exprimieren zu können. Des weiteren weiß der Fachmann, welche Vektoren für welche Zellen geeignet sind.

Erfindungsgemäß wird die L-GCR-codierende Nukleinsäure in Zellen eingeführt, um L-GCR zu exprimieren. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Verfahren und Bedingungen zur Transfektion von Zellen mit Nukleinsäure angewandt werden. Beispiele sind das Calciumphosphat-Präzipitations-, das DEAE-Dextran-, das Elektroporations- und das Lipidvesikel-Verfahren. Günstigerweise wird das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren angewandt, wobei etwa  $1-2 \times 10^6$  Zellen mit etwa 15  $\mu$ g L-GCR-codierender Nukleinsäure transfiziert werden. Als Zellen können eukaryotische und prokaryotische Zellen verwendet werden. Bevorzugt sind eukaryotische Zellen, insbesondere Säugetier-, z. B. CHO-, COS- und 293-Zellen, Hefe- und Insektenzellen. Die Zellen sind dem Fachmann bekannt und allgemein erhältlich. Die Expression von L-GCR kann indirekt nachgewiesen werden, z. B. durch Nachweis der Expression von Markersequenzen, die von der L-GCR-codierenden Nukleinsäure umfaßt werden, oder durch Ligandenbindung. Der Nachweis kann mittels üblicher, aus der Literatur bekannter Verfahren, z. B. der Immunfluoreszenz, der Immunezymologie, der ELISA-Technik, der Durchflußcytometrie und den Ligandenbindungstests erfolgen.

Erfindungsgemäß wird ein Tier mit L-GCR-exprimierenden Zellen immunisiert. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Bedingungen gewählt werden. Günstigerweise werden ca.  $3 \times 10^7$ -Zellen einem Tier zweimal verabreicht, wobei etwa 28 Tage zwischen den Verabreichungen liegen. Als Tiere können übliche Versuchstiere, insbesondere Ratten, Hamster, Kaninchen und Mäuse, verwendet werden. Als besonders günstig sind Ratten zu erwähnen.

Erfindungsgemäß werden dem immunisierten Tier Milzzellen entnommen. Dies kann in üblicher und bekannter Weise erfolgen. Günstigerweise werden Milzzellen ca. 60 Stunden nach der zweiten Verabreichung des Antigens dem Tier entnommen. Sie werden dann mit Myelomzellen mittels PEG fusioniert. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Bedingungen verwendet werden. Günstigerweise werden als Myelomzellen solche der Mäuse-Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1979), 1548-50) verwendet und das Verhältnis der Milzzellen zu den Myelomzellen beträgt etwa 1:3. Etwa 1 Woche nach Fusion werden die Überstände der fusionierten Zellen auf Antikörperproduktion getestet. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Verfahren durchgeführt werden. Günstigerweise wird eine Durchflußcytometrie durchgeführt. In ihr werden Vergleichsmessungen der Hybridomzell-Überstände auf Zellen durchgeführt, die mit L-GCR-codierenden Nukleinsäure transfiziert worden bzw. unverändert (nicht transfiziert) sind. Antikörper-produzierende Hybridomzellen werden dann durch übliche aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren, z. B. der Limiting Dilution-Technik, kloniert.

Eine solche den Antikörper RF8B2 produzierende Hybridomzelle wurde am 8. Sept. 1993 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascherodeweg 1b, 38124 Braunschweig (DSMZ) unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2153 hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper eignen sich für diagnostische Maßnahmen, insbesondere für die Bestimmung des Immunstatus eines Patienten. Hierfür werden sie z. B. mit Fluorochromen oder Biotin markiert und zusammen mit anderen markierten, allgemein erhältlichen T-Zell- bzw. B-Zell-spezifischen Antikörpern und Körperflüssigkeiten des Patienten inkubiert. Es wird der Anteil an T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, T-Helfer<sub>1</sub>- und T-Helfer<sub>2</sub>-Zellen bzw. rezirkulierenden, nicht aktivierten B-Zellen bestimmt. Dies ermöglicht eine Aussage über den Immunstatus des Patienten. Ferner können die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper zum Nachweis von Erkrankungen, insbesondere von Tumoren, Leukämien, Lymphomen, Immunschwächen und Autoimmunerkrankungen verwendet werden.

Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper für therapeutische Maßnahmen. Durch Bindung an den Rezeptor beeinflussen sie die Bindung des physiologischen Liganden oder führen durch ihre Bindung selbst zu einer Aktivierung oder Hemmung des Rezeptors. Die erfindungsgemäßen Antikörper eignen sich zur Hemmung von Entzündungen und zur Reduzierung der B- und T-Zellaktivierung. Sie können ferner die Migration und Interaktion von Zellen beeinflussen. Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen Antikörper, allein oder in Kombination mit anderen Antikörpern (z. B. gegen Adhäsionsmoleküle) oder Therapeutika, eine Tumormetastasierung zu unterdrücken. Durch Hemmung der Ligandenbindung an L-GCR wird eine Reduzierung der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen bewirkt, was entscheidend die Tumormetastasierung hemmt.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Antikörper mit bekannten Zelltoxinen, z. B. Ricin, oder Therapeutika gekoppelt werden, wodurch entartete Zellen selektiv behandelt werden können. Nach Bindung der Antikörper kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Komplexes und mithin zur effektiven Aufnahme des gekoppelten Toxins oder der Therapeutika. Der vorstehend genannte Antikörper RF8B2 ist hierfür besonders geeignet, da er der Subklasse IgG<sub>2b</sub> angehört, die bekannterweise äußerst gering immunogen ist.

Die erfindungsgemäßen Antikörper werden für die Verabreichung in therapeutischen Maßnahmen, z. B. als Medikament, in üblicher Weise konfektioniert.

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der sich zur Durchführung vorstehend angesprochener diagnostischer Maßnahmen eignet. Ein solcher Kit enthält

- markierten L-GCR-Antikörper, übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper, oder
- markierten L-GCR-Antikörper und markierten T-Zell-spezifischen Antikörper und/oder B-Zell-spezifischen Antikörper sowie übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper.

Ergänzend wird ausgeführt, daß in Schritt (a) des vorstehenden Verfahrens zur Herstellung von L-GCR-Antikörpern die L-GCR-codierende Nukleinsäure durch eine Nukleinsäure ersetzt werden kann, die für einen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GCR), z. B. einen Hormon- oder Neurotransmitter-Rezeptor codiert. Dies führt dann zur Expression von GCR in Zellen und weiter nach Immunisierung eines Tieres mit solchen Zellen und Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres mit Myelomzellen zu Hybridomzellen, die monoklonale GCR-Antikörper produzieren. Erfindungsgemäß wird also auch ein Verfahren bereitgestellt, das sich zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eignet.

Schließlich wird darauf hingewiesen, daß anstelle der Schritte (a) und (b) des vorstehenden Verfahrens zur Herstellung von L-GCR- bzw. GCR-Antikörpern die Nukleinsäure direkt in ein Tier zur Expression von L-GCR bzw. GCR eingeführt werden kann, wodurch das Tier immunisiert wird. Ferner kann anstelle der Fusion von Schritt (c) ein anderes aus dem Stand der Technik bekanntes Verfahren zur Immortalisierung von Milzzellen verwendet werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

## Beispiel 1

## Konstruktion eines Plasmids zur Expression von L-GCR in eukaryotischen Zellen

- 5 Eine für L-GCR-codierende cDNA (vgl. Lipp et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22, 2795–2799) wurde in die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI des bekannten und allgemein erhältlichen prokaryotischen Klonierungsvektors pBluescript II KS+ eingefügt, wobei zuvor folgende Modifizierungen vorgenommen wurden. Im 5'-untranslatierten Bereich wurde mittels eines synthetischen Oligonukleotids 10 Basenpaare vor dem Translationsstartcodon eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI eingefügt und der Bereich vor dem
- 10 Translationsstartcodon derart verändert, daß eine effiziente Initiation der Translation erfolgt (vgl. Kozak M., Cell (1986) 44, 283–292). Das Translationsstopcodon wurde mittels Polymerasekettenreaktion entfernt und die L-GCR-codierende DNA mit einem synthetischen Oligonukleotid derart rekombiniert, daß auf Proteinebene an den Carboxy-Terminus des L-GCR-Proteins die Aminosäuresequenz PGGSGPEQKLISEEDLL fusioniert wurde. Die Sequenz der letzten 11 Aminosäuren stammt aus dem MYC-Protein und wird vom monoklonalen
- 15 Antikörper 9E10 erkannt (vgl. Bishop, J.M. et al., Mol. Cell. Biol. 5 1985), 3610–3616; Munro S., Cell 46 (1986), 291–300), während die ersten sechs Aminosäuren als Abstandshalter dienen, um eine ungestörte Faltung des MyC-Epitops zu ermöglichen. Die erhaltene rekombinante DNA wurde in die Restriktionsschnittstellen HindIII und XbaI des bekannten und allgemein erhältlichen eukaryotischen Expressionsvektors Rc/CMV, der die Expression mittels eines heterologen CMV-Promotors ermöglicht, eingefügt. Es wurde das mit pBLR1-MYC<sub>c</sub>
- 20 bezeichnete Plasmid erhalten.

## Beispiel 2

## Expression von L-GCR in eukaryotischen Zellen

- 25 Zur Expression von L-GCR in Eukaryoten wurde die humane embryonale Nierentumorzelllinie 293 (ATCC CRL 1573) verwendet. Hierzu wurden ca.  $1-2 \times 10^6$  Zellen mit 15 µg des Plasmids von Beispiel 1 mittels Calciumphosphat-Präzipitationstechnik transfiziert. Die Plasmid-DNA wurde zuvor aus den transformierten Bakterien über Ionenaustauschchromatographie isoliert. Zur Etablierung stabil exprimierender Zelllinien wurden
- 30 Antibiotika-resistente Zellen des Transfektionsansatzes durch Zusatz von Neomycin (200 µg/ml) angereichert und in der Expression des L-GCR-MYC-Fusionsproteins wurden positive Zelllinien durch Einzelzellverdünnung isoliert. Die Kontrolle der Expression des Fusionsproteins erfolgte sowohl bei transient als auch bei stabil transfizierten Zellen mittels Durchflußcytometrie an permeabilisierten Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 9E10.

35

## Beispiel 3

## Herstellung monoklonaler Antikörper

## 40 Immunisierung einer Ratte

Weibliche, acht Wochen alte, Lou/C Ratten wurden mit je  $3 \times 10^7$  lebenden L-GCR-transfizierten 293-Zellen immunisiert. Nach 28 Tagen erfolgte der Booster mit der gleichen Menge des Immunogens.

45

## Zellfusion

- 60 Stunden nach der letzten Immunogenverabreichung wurde die Fusion in üblicher Weise durchgeführt (vgl. z. B. Köhler G. und C. Milstein, Nature 256 (1975), 495–497). Hierbei wurde der immunisierten Ratte unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen, durch ein Sieb zerrieben und die gewonnenen Zellen wurden im Verhältnis 1 : 3 mit Zellen der Mäuse-Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1979) 1548–1550) mit Hilfe von PEG fusioniert. Eine Woche nach der Aussaat in Flachbodenplatten in HAT-Selektivmedium wurde das Kolonie-Wachstum protokolliert und die Zellkulturüberstände koloniehaltiger Vertiefungen wurden im Durchflußcytometer (vgl. nachstehend) vergleichend auf stabilen L-GCR-exprimierenden 293 Zellen und normalen 293 Zellen auf das Vorhandensein L-GCR-spezifischer Antikörper getestet. Nur solche Antikörper, die an transfizierten Zellen gebunden haben, nicht jedoch an normalen 293 Zellen, wurden nach der Limiting dilution-Technik kloniert, weitervermehrt, auf transient transfizierten 293 Zellen und schließlich auf peripheren Leukozyten getestet.

60

## Durchflußcytometrie

- Das Vorhandensein von L-GCR-Antikörpern wurde mittels Durchflußcytometrie getestet. Als Testsystem wurden vergleichende Messungen an L-GCR-transfizierten und unveränderten 293 Zellen durchgeführt. Je 25 µl Hybridomzellen-Überstand wurden mit 25 µl der jeweiligen Zellsuspension ( $1 \times 10^7$ /ml) für 25 min bei RT inkubiert. Nach Waschen in PBS (4% FKS, 5 mM EDTA) wurden die Zellen mit einer 1:160 Verdünnung eines
- 65 polyklonalen Ziegeanti-Ratte-FITC Konjugates versetzt. Nach 25-minütiger Inkubation und anschließendem Waschen erfolgte der Nachweis einer spezifischen Bindung mittels eines FACScan Durchflußcytometers. Je Probe wurden 5000 Zellen gemessen und die Fluoreszenzintensität der Zellpopulation wurde analysiert. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität von transfizierten und unveränderten 293 Zellen konnten solche Anti-

körper identifiziert werden, die spezifisch an L-GCR binden.

#### Bindungsstudien des erfindungsgemäßen Antikörpers RF8B2

Vorstehend angegebene 293 Zellen wurden mit L-GCR codierender DNA in üblicher Weise transfiziert bzw. nicht transfiziert. Letztere Zellen wurden als mock-transfiziert bezeichnet. Der erfindungsgemäße Antikörper RF8B2 wurde in üblicher Weise mit Biotin markiert und den Zellen zugegeben. Es zeigte sich, daß RF8B2 an transfizierte 293 Zellen bindet, nicht jedoch an mock-transfizierte (vgl. Fig. A).

Des weiteren wurden periphere Leukozyten des Blutes über Ficoll gereinigt und mit dem T-Zell-spezifischen Antikörper CD4-FITC (B) oder CD8-FITC (C) bzw. mit dem B-Zell-spezifischen Antikörper CD19-FITC (D) angefärbt. Anschließend wurde der Biotinmarkierte Antikörper RF8B2 zugegeben. Es zeigte sich, daß 100% der B-Zellen (CD19-positiv) (D) diesen Antikörper binden. Hingegen wird RF8B2 nur von ca. 14% der T-Helfer-Zellen (CD4-positiv) (B), und ca. 2% der zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) (C) gebunden (vgl. Fig. B, C und D). Dies zeigt die Verwendbarkeit von RF8B2, eine unterschiedlich starke Expression von L-GCR aufzuzeigen.

#### Produktion und Reinigung von Antikörpern

Probenpuffer	pH 7,4	PBS
Elutionspuffer	pH 2,5	0,05 M Glycin 0,05 M NaCl
10fach Tris-HCl-Puffer	pH 8,6	0,5M Tris 1,5M NaCl

Die Hybridomzellen wurden im RPMI mit 10% IgG-freiem FKS vermehrt, alle 2–3 Tage 1 : 3 geteilt und der Zellkulturüberstand wurde gesammelt. Zur Abtrennung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand wurde die Protein G-Affinitätschromatographie verwendet (vgl. Björck und Kronvall, J. Immunol. 132 (1984) 969–974). Hierzu wurde 1 g Protein G Sepharose 4 Fast Flow nach Quellung in eine Chromatographiesäule gepackt und mit PBS äquilibriert. 200 ml des zu reinigenden Überstandes wurden nach Mikrofiltration auf die Säule aufgebracht. Ein Wechsel von PBS auf Elutionspuffer löste die an die Sepharose gebundenen Antikörper. Die dem Extinktions-Peak entsprechenden Eluatfraktionen wurden gegen PBS-dialysiert.

#### Markierung von Antikörpern

##### Biotin-Markierung

Kupplungspuffer	pH 7,4	PBS
Biotinpräparat	NHS-LC-Biotin	

Hierbei wurde die Kupplung mit Abwandlungen wie beschrieben, ausgeführt (vgl. z. B. Peters et al., Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag, Berlin (1985)). Protein G gereinigte Eluate wurden auf 2 mg/ml eingestellt und gegen Kupplungspuffer 24 Stunden dialysiert. Zur Reaktion wurden 50 µl Biotinlösung (8 mg Biotin in 1 ml DMF) zu 1.0 ml MAK-Lösung gegeben und 90 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Dialyse gegen PBS- und Sterilzentrifugation wurden die Konjugate bei –20°C gelagert.

##### FITC-Konjugate

Kupplungspuffer	pH 9,5	0.1M NaHCO <sub>3</sub>
-----------------	--------	-------------------------

FITCpräparat Fluoresceinisothiocyanat, Protein G gereinigte Eluate wurden auf 2 mg/ml eingestellt und mit 1/10 Vol. 10fach Kupplungspuffer versetzt. Zur Reaktion wurden 60 µl FITClösung (1 mg FITC in 1 ml Kupplungspuffer) zu 1.0 ml MAK-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Dialyse gegen PBS- und Sterilzentrifugation wurden die Konjugate bei –20°C gelagert.

#### Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper gegen Leukozyten-spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptor (L-GCR), erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

(a) Einführung einer L-GCR-codierenden Nukleinsäure in Zellen und Expression von L-GCR.

- (b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und  
 (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2153 hinterlegt worden ist.
  3. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure eine DNA ist.
  4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine cDNA ist.
  5. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure Markersequenzen umfaßt.
  6. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure in einer Expressionseinheit vorliegt.
  7. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen eukaryotische Zellen umfassen.
  8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen Säugetier-, Hefe- und Insektenzellen umfassen.
  9. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Tiere Ratten, Hamster, Kaninchen und Mäuse umfassen.
  10. Kit, enthaltend
    - markierten L-GCR-Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 9, übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper oder
    - markierten L-GCR-Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und T-Zell-spezifischen Antikörper und/oder B-Zell-spezifischen Antikörper sowie übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper.
  11. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GCR), gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
    - (a) Einführung einer GCR-codierenden Nukleinsäure in Zellen und Expression von GCR,
    - (b) Immunisierung eines Tieres mit GCR-exprimierenden Zellen von (a), und
    - (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale, GCR-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

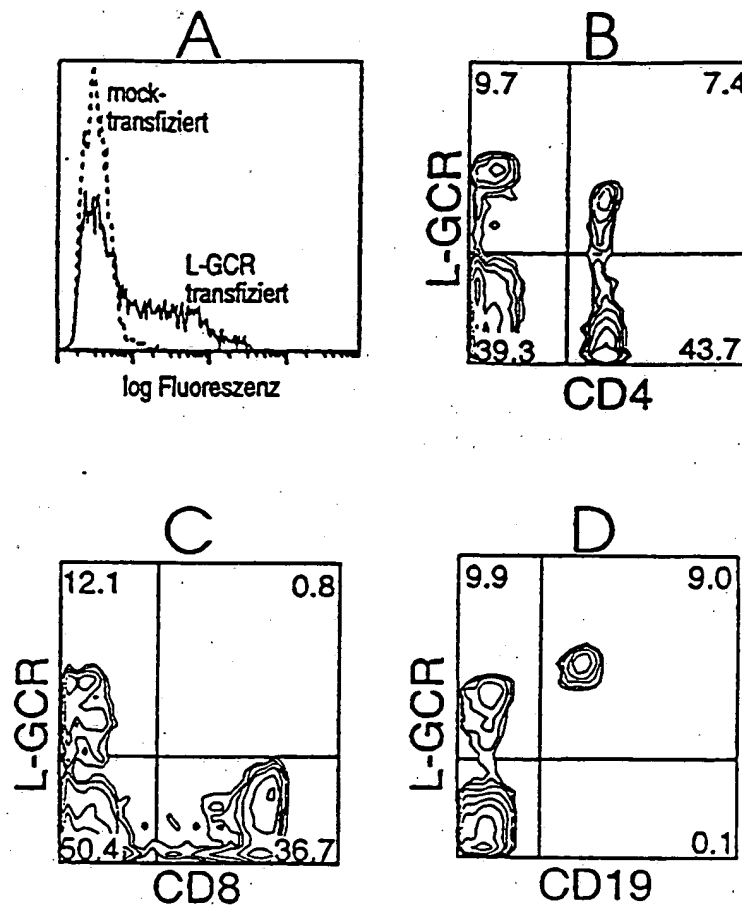


Fig.: Bindungsstudien der erfindungsgemäßen Antikörper RF8B2 an 293 Zellen und peripheren Leukozyten



# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## URKUNDE

über die Erteilung des  
**Patents**

Nr. 43 32 256

**Bezeichnung:**

Monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

**Patentinhaber:**

Lipp, Martin, Dr. Dr.habil., 80339 München, DE

**Erfinder:**

Lipp, Martin, Dipl.-Biol. Dr., 80339 München, DE; Förster, Reinhold, Dr., 81375 München, DE; Emrich, Thomas, Dipl.-Chem., 82393 Iffeldorf, DE; Wolf, Ingrid, Dipl.-Biol., 81371 München, DE; Kremmer, Elisabeth, Dr., 85354 Freising, DE

Tag der Anmeldung: 22.09.1993

München, den 09.03.1995

Der Präsident  
des Deutschen Patentamts



Prof. Dr. Häußer